

ESSAI DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE L'HELMINTHOSPORIOSE DE L'ORGE PAR L'UTILISATION D'UNE SOUCHE PEU AGRESSIVE DE *DRECHSLERA TERES*

M. MOSTAFA, G. BARRAULT et L. ALBERTINI

Laboratoire d'Ingénierie Agronomique, Ecole Nationale Supérieure
Agronomique, 145 avenue de Muret
31076 TOULOUSE Cédex, FRANCE

RÉSUMÉ - L'utilisation préventive d'une souche peu agressive de *D. teres* contre une souche parasite de l'orge, montre que l'application de la suspension mycélienne ou du filtrat brut sur le limbe foliaire provoque une réduction de l'attaque ultérieure par une souche agressive, qui se traduit à la fois par une diminution du nombre de sites d'infection et une réduction de la taille des nécroses. Le mésophylle du limbe d'orge confronté au filtrat toxique de la souche faible, et contaminé ultérieurement par une souche agressive est peu altéré par rapport au témoin.

ABSTRACT - The preventive use of a weakly aggressive strain against *D. teres*, the causal agent of barley net blotch, showed that the application of the mycelial suspension or of crude filtrate on the leaf lamina subsequently induced decreased attack by aggressive strain, is reflected by the decreased number of infection sites and by the decreased size of necroses. Barley lamina mesophyll in the presence of the toxic filtrate of the hypoaggressive strain, which was followed by inoculation with an aggressive strain, was little allowed with respect to that of the control plants.

MOTS CLÉS : Lutte biologique, Hypoagressivité, *Drechslera teres*, *Hordeum vulgare*.

INTRODUCTION

L'emploi de produits phytosanitaires constitue une menace pour les écosystèmes, par la pollution des eaux superficielles et souterraines. Ces produits peuvent également déclencher des manifestations pathologiques chez l'homme, liées d'une part à la présence de résidus dans les denrées alimentaires, et d'autre part aux risques inhérents à l'emploi de ces produits. Par ailleurs, l'utilisation généralisée et répétée de ces matières actives est susceptible d'entraîner la sélection de souches résistantes (Sheridan & Grabavac, 1985; Leroux, 1991). En outre, certains fongicides peuvent stimuler la croissance et la morphogénèse conidienne de certains pathogènes (Jordan & Best, 1981).

Dans ce contexte, la lutte biologique qui repose sur plusieurs mécanismes (antagonisme, compétition trophique, hyperparasitisme, et hypovirulence) peut constituer une méthode de lutte alternative tout à fait intéressante. Chez les champignons phytopathogènes, le phénomène d'hypovirulence a été observé chez *Gaeumannomyces graminis* où des souches hypovirulentes sont capables d'exclure la souche pathogène

virulente (Tivoli et al., 1974; Lemaire et al., 1982). Chez *Endothia parasitica*, parasite du châtaignier, les souches hypovirulentes transmettent ce caractère dans les souches virulentes (Grente & Sauret, 1969; Anagnostakis & Day, 1979; Jaynes & Elliston, 1981; Kuhlman et al., 1984). Dans le même ordre d'idées, l'action préventive d'une souche non pathogène d'*Alternaria alternata* sur le tabac réduit de 60% la sévérité des symptômes au champ (Spurr, 1977). Le trempage des boutures de patate douce dans une suspension conidienne d'une souche hypoagressive de *Fusarium oxysporum* entraîne une protection ultérieure de ces boutures contre les attaques consécutives à un repiquage dans un sol naturellement infesté par la souche pathogène (Ogawa & Komada, 1984).

Le but du présent travail est de contribuer à l'essai d'une méthode de lutte biologique par l'utilisation d'une souche peu agressive contre un parasite de l'orge, *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker, anamorphe de *Pyrenophora teres* Drechs. dont le développement en France depuis 10 ans a été spectaculaire. Cette maladie peut être qualifiée de iatrogène dans la mesure où l'environnement chimique stimule certaines séquences biologiques et épidémiologiques du pathogène (Toubia-Rahme et al., 1992). C'est actuellement une affection fongique majeure du complexe phytopathogène de l'orge susceptible de causer des chutes de rendement tangibles. La maladie peut être provoquée par les deux formes: *D. teres* f. *teres* et *D. teres* f. *maculata* (Barrault, 1989).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Matériel fongique

Dix souches monoconidiennes polycaryotiques et hétérocaryotiques isolées à partir de différents cultivars provenant de diverses régions sont répertoriées sous forme alpha-numérique:

La lettre indique la nature du facies d'origine [R= facies réticulé (R₁, R₂, R₃, R₄, R₅) S= facies spot macula (S₆, S₇, S₈, S₉, S₁₀)]. Le chiffre indique le numéro de l'isolat à l'intérieur d'un même facies (Mostafa, 1982; Barrault, 1989).

Les souches de *D. teres*, ensemencées sur un milieu liquide, statique (V₈ à 10%) dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml, à raison de 40 ml par récipient, sont mises à incuber à 23°C, à l'obscurité. Après 10 jours de culture, le mycélium est filtré sur un entonnoir cylindro-cônnique à plaque filtrante, en verre borosilicaté (Φ 2, diamètre 70 mm) à l'intérieur duquel on place un filtre sans cendres Durieux N°III (filtration rapide), et finement dispersé à l'aide d'un broyeur "Auto-Mix" (6000t/mn pendant 1 mn) de sorte que la concentration finale en fragment de mycélium soit de l'ordre de 10⁶ par ml.

2) Matériel végétal

Les plants d'orge (stade 3 feuilles) issus de semences d'orge (variété Thibaut) désinfectées à l'hypochlorite de sodium (10%) puis rincées énergiquement avec l'eau distillée, sont semées dans des bacs contenant du terreau préalablement stérilisé à la chaleur (120°C pendant 1 heure). Le terreau est humidifié périodiquement à l'aide d'une solution nutritive de Knop (NaNO₃ 1g; KNO₃, 0,25g; MgSO₄, 7H₂O 0,25g; KH₂PO₄ 0,25g; FeCl₃ traces /1000 ml d'eau).

3) Détermination du pouvoir pathogène des dix souches de *D. teres*

La contamination (au stade 3 feuilles) par pulvérisation foliaire est réalisée sous la forme d'une suspension mycélienne (25 ml/bac) à laquelle on adjoint de la gélatine (0,25%)

Les plants d'orge ainsi contaminés sont recouverts d'un sac en plastique pendant 48h pour maintenir une humidité saturante favorable à la contamination et au développement du pathogène au cours de la phase d'incubation. Les essais se déroulent dans une serre où les paramètres climatiques sont les suivants: température= 18-20°C, humidité relative=85-95% et intensité lumineuse 12h/j(60Wm⁻²).

Les essais sont réalisés en blocs randomisés avec 4 répétitions. L'analyse de variance est fondée sur la moyenne.

4) Confrontation de la souche la moins agressive (S₁₀) avec la souche la plus agressive (R₃) *in vivo*.

Les suspensions mycéliennes de R₃ et S₁₀ comprenant 10⁶ fragments/ml (20 ml) ont été appliquées soit simultanément, soit successivement. L'application de R₃ étant effectuée 24 heures ou 48 heures après celle de S₁₀. Un témoin (application de la souche R₃ seule) ■ été réalisé.

5) Etude de l'action du filtrat de la souche (S₁₀)

Le filtrat de S₁₀ est obtenu à partir de cultures effectuées sur milieu Fries (incubation pendant 10 jours à 23°C, à l'obscurité), puis filtrées stérilement sur un filtre GELMAN ($\Phi = 0,2$ mm). Le filtrat brut a été expérimenté après dilution avec de l'eau distillée stérile, aux trois concentrations suivantes: 10%, 25%, et 50% du filtrat initial. La contamination par la souche R₃ est faite 24 heures ou 72 heures après l'application du filtrat.

Les plantes ayant reçu seulement la pulvérisation de fragments mycéliens de R₃ (10⁶ fragments mycéliens/ml) constituent le témoin. L'intensité de la maladie est déterminée 10 jours après la contamination par R₃.

L'intensité de l'attaque est définie d'après une échelle de notation allant de 0 à 9 (0 = absence de symptômes, 1= < 2,5%; 2= 2,5% - 5%; 3= 5% - 10%; 4= 10% - 20%; 5= 20% - 30%; 6= 30% - 40%; 7= 40% - 50%; 8= 50% - 75%; 9= > 75%) de surface foliaire malade (nécrose + chlorose).

6) Anatomie foliaire

Les coupes (20 à 40 μ m) réalisées à partir de fragments foliaires sains (témoin) et malades, sont obtenues au moyen d'un microtome à main. Les différentes coupes d'une série ont été réparties en 3 lots, le premier lot de coupes étant coloré pendant 5 mn. par le bleu coton-acétique (bleu coton C4B 5 g., acide acétique cristallisé 5g, eau distillée 100 ml), le second lot pendant 15 mn. par le bleu de résorcine à 1% dans l'éthanol à 95°: 0,1 ml + eau distillée (25 ml), le troisième lot pendant 30 min. par le rouge de Ruthénium (0,2% en solution aqueuse à pH 10).

Les coupes sont montées entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine diluée au 1/2 dans du Duplex (milieu permettant le montage permanent des préparations sans déshydratation préalable).

RÉSULTATS

Détermination du pouvoir pathogène des dix souches de *D. teres*

L'examen de la Fig. 1 montre que quelle que soit la feuille considérée, la souche S_{10} apparaît être la moins agressive (l'intensité de la maladie est égale à 6 sur la 1ère feuille, et 2,1 sur la 2ème feuille). R_3 est en revanche la plus agressive (8,9 sur la 1ère feuille, et 4,8 sur la 2ème feuille).

Confrontation de la souche la moins agressive (S_{10}) avec la souche la plus agressive (R_3)

* confrontation directe (mycélium)

Les résultats de la figure 2 montrent que si la souche S_{10} est appliquée préventivement (48 h avant la contamination par la souche R_3) l'attaque sur les 1ère et 2ème feuilles est fortement diminuée par rapport à celle consécutive à une application simultanée $S_{10} + R_3$. Une application de R_3 , 24h après celle de S_{10} , provoque sur la 2ème feuille une attaque dont l'intensité est intermédiaire entre les deux essais précités.

■ confrontation indirecte (filtrat)

En complément de ces observations, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet de différentes dilutions du filtrat de la souche S_{10} sur l'intensité de l'attaque de plantes d'orge, par la souche hyperagressive R_3 .

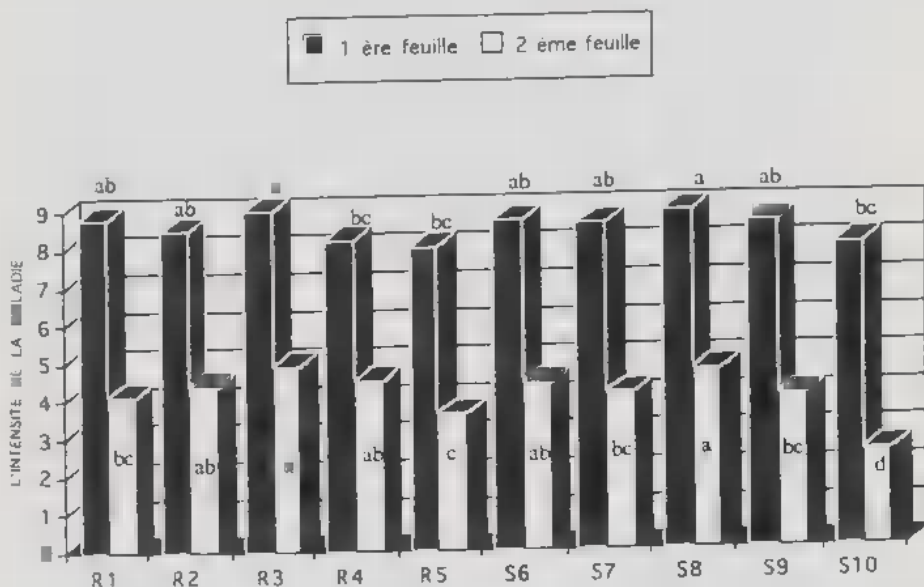


Fig. 1 - Agressivité de 10 souches de *D. teres* appréciée par le niveau de gravité des symptômes observés sur orge (var. Thibaut).

Fig. 1 - Effect of ten *D. teres* strains on the incidence of barley (var. Thibaut) net blotch. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

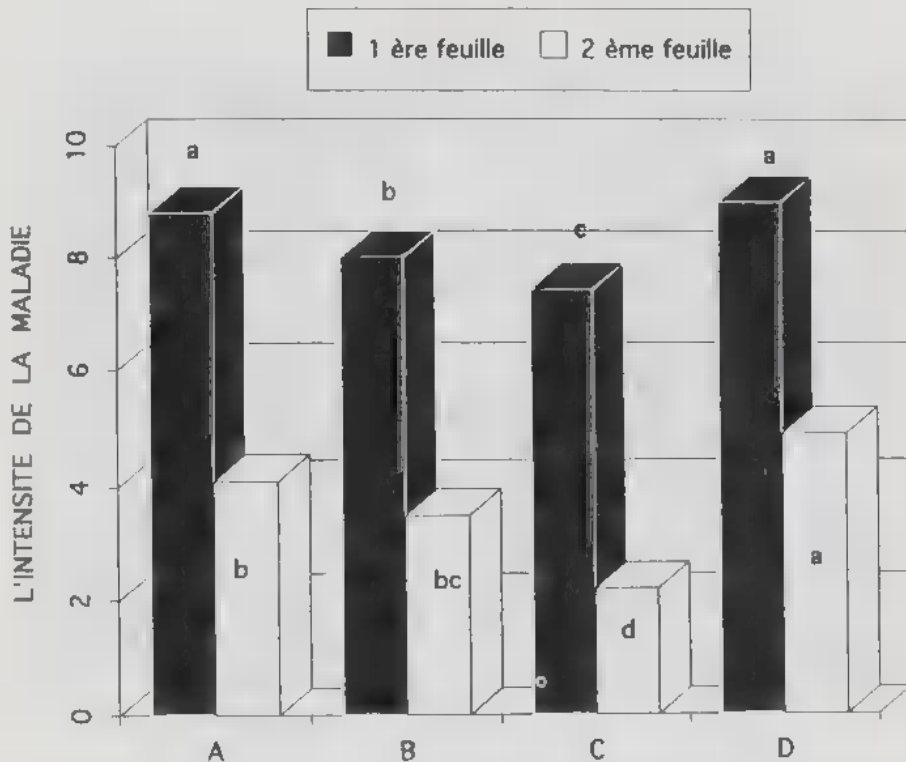


Fig. 2 - Aggressivité de la souche R_3 de *D. teres* sur orge (var. Thibaut) en présence de la souche S_{10} inoculée en même temps, 24h et 48h après.

Fig. 2 - Aggressivity of barley net blotch strain R_3 in the presence of strain S_{10} inoculated simultaneously or subsequently.

Les moyennes suivies de la même lettre ■ sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

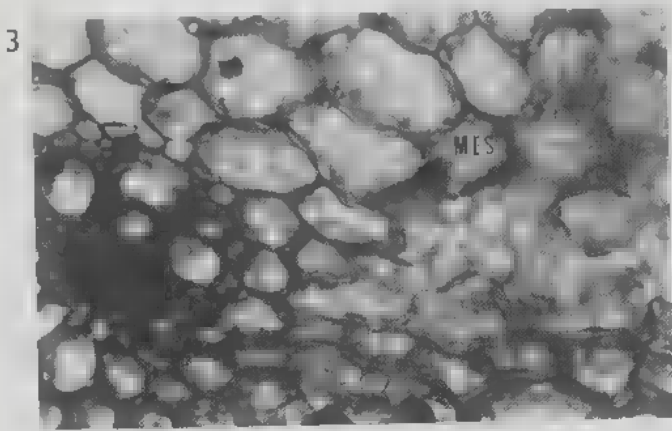
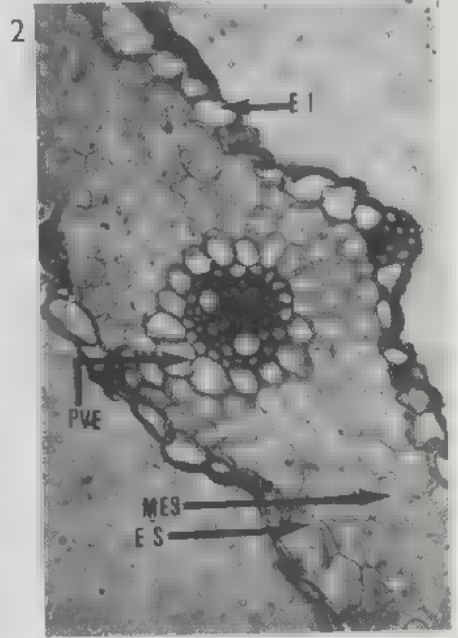
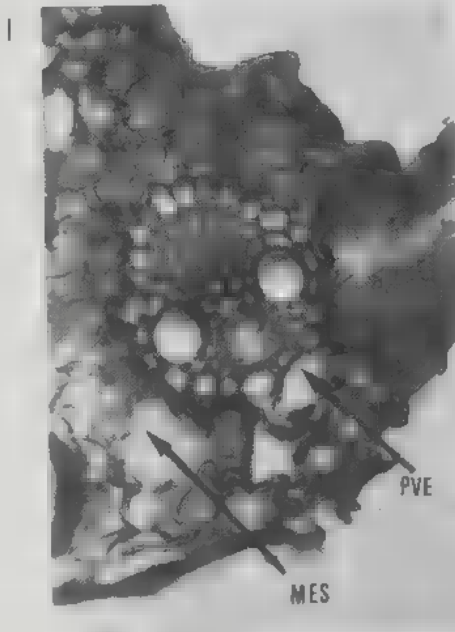
- 1 = R_3 et S_{10} simultanée
- 2 = S_{10} suivi de R_3 24h après
- 3 = S_{10} suivi de R_3 48h après
- 4 = Témoin R_3 seul.

Le filtrat de S_{10} à 50%, est phytotoxique, il entraîne l'apparition de nécroses sur les feuilles. Les filtrats dilués à 10% et 25% ne sont pas phytotoxiques; ces derniers, appliqués 72h avant la contamination par R_3 , réduisent très nettement la sévérité de l'attaque par R_3 , sur la 2ème feuille (Tableau 1).

Anatomie foliaire (Planche 1)

Témoin R_3 (Photo 2)

Les cellules du parenchyme chlorophyllien ont subi dans la zone nécrotique d'importantes altérations qui se traduisent par un brunissement et un affaissement cellulaire; il en résulte une réduction de l'épaisseur de la zone altérée par rapport au



témoin. La paroi des cellules du parenchyme chlorophyllien perd de son intégrité, on voit apparaître des lacunes parfois assez grandes, qui jouxtent les faisceaux vasculaires. Alors que la paroi pecto-cellulosique des cellules de la gaine externe des faisceaux vasculaires se lyse fréquemment en désolidarisant ainsi les faisceaux du reste du limbe, les cellules de la gaine interne (à paroi subérifiée) et les éléments des faisceaux vasculaires (notamment du xylème) conservent une structure pseudo-normale.

Filtrat toxique appliqué 72h avant la contamination par R_3 (Photo 3).

Par rapport au témoin R_3 (Photo 2), les cellules des mésophylles et les cellules de la gaine périvasculaire externe restent quasi intactes, si ce n'est la présence de quelques lacunes de faible taille.

DISCUSSION

Dans la recherche de souches de faible agressivité de *D. teres* pouvant jouer un rôle dans le contrôle biologique du parasite, la souche peu agressive de *D. teres* (S_{10}) en tant que telle ou par l'intermédiaire de son filtrat de culture peut entraîner une réduction du taux d'infection par une souche hyperagressive R_3 . Un certain délai est nécessaire entre la préinoculation par S_{10} et l'inoculation par R_3 pour permettre ■ phénomène de "prémunition" de s'exprimer (72h.) Matta (1966) et Littlefield (1969) ont obtenu une prémunition, respectivement contre la fusariose de la tomate et la rouille du lin, qui se maintient tout au long de la vie de la plante. Mas (1967), indique que l'effet de la pré-inoculation par la souche hypovirulente peut ■ traduire aussi par un retard dans l'apparition de la maladie.

Dans le cas de la préinoculation de l'orge avec le filtrat toxique de la souche S_{10} , on remarque que ce filtrat toxique confère ■ mésophylle du limbe une "résistance" relative à l'attaque de la souche R_3 de *D. teres*. Cette observation nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la souche S_{10} pourrait induire, chez l'hôte, la production de substances de défense qui entraveraient le développement du pathogène R_3 dans l'hôte en limitant ainsi la taille de la lésion produite par R_3 . L'ensemble des travaux sur les phytotoxines de *D. teres* montrent qu'il existe deux toxines thermostables (A et B) pour les deux formes (R et S) non spécifiques, dialysables et de faibles poids moléculaires; elles réagissent positivement à la ninhydrine et sont apparentées à des peptides (Smedegard-Petersen, 1977). Les toxines A et ■ ont été isolées à partir de feuilles malades (et jamais dans les feuilles saines) à une concentration très variable (allant de l'état de traces à de très fortes concentrations); cette

Planche 1 - Modifications anatomiques induites par *D. teres* souche (R_3) sur le limbe d'orge seul (2); ou "préinoculé" 72h auparavant par le filtrat de S_{10} à 50% (3).

Plate 1 - Responses of barley leaf tissue infected with *D. teres* strain R_3 (2) preinoculated 72h earlier with S_{10} filtrate.

1) Coupe transversale dans une feuille d'orge: - épiderme supérieur (ES) - épiderme inférieur (EI) - mésophylle (MES) - gaine périvasculaire externe (PVE).

2) Coupe transversale dans une feuille d'orge infectée par *D. teres* souche R_3 . On observe une lyse cellulaire entraînant la formation de lacunes dans le mésophylle et une altération des cellules de la gaine périvasculaire externe.

3) Coupe transversale dans une feuille d'orge infectée par la souche R_3 et préinoculée 72h auparavant par le filtrat de S_{10} à 50%. On observe quelques altérations formant de petites lacunes dans le mésophylle (3).

application préventive du filtrat de S ₁₀	Concentration	% de feuilles malades	sévérité de l'attaque sur la 2 ^{ème} feuille
24 heures	10%	59,9 ab	5,86 ab
	25%	63,3 ab	5,52 ab
72 heures	10%	49,9 bc	4,86 bc
	25%	33,4 c	3,98 cd
Temoin		79,2 ■	6,22 ■

Tableau 1 - Agressivité de *D. teres* (R₃) sur plantules d'orge (Var. Thibaut) stade 3 feuilles, prétraitées par le filtrat brut toxique dilué de la souche S₁₀.

Table 1 - Effect of preventive applications of strain S₁₀ filtrates on the reduction of leaf lesion by *D. teres* strain R₃.

- Essai effectué en serre: Lumière: 12h/j, T°: 15-18°C, avec 4 répétitions de 10 plantes réparties en pots ■ polychlorure de vinyl. Observations effectuées 15j après la dernière application de R₃. Contamination artificielle: 10⁶ fragments/ml.

- La sévérité de l'attaque est fondée sur la moyenne des notations réalisées sur la 2^{ème} feuille d'après une échelle de notation de 0 à 9.

- Les données sont transformées en arc sinus (%)^{1/2}.

- (*) Les valeurs accompagnées de la même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Test de Newman - Keuls).

variabilité étant due vraisemblablement à la dégradation des toxines durant le développement de la maladie (Barrault, 1989)

D'après les travaux de Barrault (1989) sur le pouvoir "nécrogène" des filtrats de différentes souches de *D. teres*, on peut penser que le filtrat toxique de la souche S₁₀ de l'hôte peut induire la formation de "substances" dont l'interférence avec une éventuelle liaison toxines-récepteur(s) membranaire(s) pourrait aboutir à l'absence de

réponse de l'hôte vis-à-vis du complexe toxique du pathogène. On peut envisager également que ces substances puissent agir directement sur le complexe toxique de R₃, en le détoxifiant.

Nous avons montré que l'emploi d'une souche hypoagressive ou du filtrat toxique provenant de celle-ci réduit significativement la sévérité de la maladie sur le limbe foliaire.

La méthode de lutte biologique par application d'antagonistes fongiques et/ou bactériens et/ou de souches hypoaggressives doit être prise en compte dans une composante de lutte intégrée. Elle devrait pouvoir judicieusement compléter l'action d'une lutte chimique, alors plus modérée, et de façons culturales idoines, susceptibles de réduire la pression d'inoculum du pathogène sans gêner (ou mieux exacerber) le développement des antagonistes et/ou des souches hypoaggressives appliquées.

BIBLIOGRAPHIE

- ANAGNOSTAKIS S.L. and DAY P.R., 1979 - Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69: 1226-1229.
- BARRAULT G., 1989 - L'helminthosporiose de l'orge causée par *Drechslera teres*. Thèse Doctorat d'Etat. I.N.P. E.N.S.A. Toulouse, France. 435p.
- GRENTE J. et SAURET S., 1969 - L'hypovirulence "exclusive" phénomène original en pathologie végétale. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 268: 3173-3176.
- JAYNES R.A. and ELLISTON J.E., 1980 - Pathogenicity and canker control by mixtures of hypovirulent strains of *Endothia parasitica* in American Chestnut. *Phytopathology* 70: 453-456.
- JORDAN V.W.L. and BEST G.R., 1981 - Evaluation of fungicide treatment for control of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres*. *Proc. British Crop Protection Conf. Pest and Diseases* 1: 249-258.
- KUHLMAN E.G., BHATTACHARYYA H., NASH B.L., DOUBLE M.L. and MAC DONALD W.L., 1984 - Identifying hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* with broad conversion capacity. *Phytopathology* 74: 676-682.
- LEMAIRE J.M., DOUSSINAULT G., LUCAS P. et PERRATON B., 1982 - Possibilité de sélection pour l'aptitude à la prémunition dans le cas du piétin échouage (*Gaeumannomyces graminis*). *Agronomie* 3: 90.
- LEROUX P., 1991 - Résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides. *Phytoma* 434: 20-26.
- LITTLEFIELD L.J., 1969 - Flax rust resistance induced by prior inoculation with an avirulent race of *Melampsora lini*. *Phytopathology* 59: 1323-1328.
- MAS P.M., 1967 - Protection du melon contre la fusariose par injection de la plantule avec d'autres souches de *Fusarium*. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France.* 63: 1034-1046.
- MATTA A., 1966 - Immunizanta di alcuni micromiceti verso le infezioni di *Fusarium oxysporium f lycopersici* su pomodoro. *Ann. Fac. Sci. Univ. Torino* 3: 85-96.
- MOSTAFA M., 1982 - Recherches sur la lutte biologique contre l'*Helminthosporium teres*, parasite de l'orge (*Hordeum sativum*) par l'utilisation de microorganismes antagonistes et d'une souche hypoagressive. Thèse Docteur Ingénieur, I.N.P. Toulouse, France 159p.
- OGAWA K. and KOMADA H., 1984 - Biological control of *Fusarium* wilt of sweet potato by non pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 1-9.
- PURKAYASTHA R.P., 1989 - Modern approaches to biocontrol of crop pathogens and their implications. *Indian J. Mycol. Res.* 27: 1-6.

- SHERIDAN J.E. and GRABAVAC N., 1985 - Cultivar differences in response to triadimenol seed treatment for control of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres*. *Pl. Disease* 69: 77-80.
- SMEDEGARD-PETERSEN V., 1977 - Isolation of two toxins produced by *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net spot blotch of barley. *Physiol. Pl. Path.* 10: 203-211.
- SPURR H.W. JR., 1977 - Protective application of conidia of nonpathogenic *alternaria* sp. isolates for control of tobacco brown-spot disease. *Phytopathology* 67: 128-132.
- SY A.A., ALBERTINI L., MOLETTI M. and HAMANT CL., 1991 - Mécanismes potentiels régissant le contrôle biologique des agents phytopathologiques *Cryptogamie, Mycol.* 12: 133-147.
- TIVOLI B., LEMAIRE J.M. et JOUAN B., 1974 - Prémunition du blé contre *Ophiobolus graminus* Sacc. par souches peu agressives du même parasite. *Ann. Phytopathol.* 6: 395-406.
- TOUBIA-RAHME H., 1982 - Effet de l'environnement chimique sur le développement de *Drechslera teres* (Sacc) Shoem parasite de l'orge. Thèse Doctorat de l' I.N.P. Toulouse, France 106p.